文章编号:1000-5404(2007)24-2357-04

论著

不同温度生理盐水对大鼠脊髓组织形态及一氧化氮合酶表达的影响

高宜录[1],刘志国[1],沈剑虹[1],吕广明[2],张天一[3] (南通大学:[1]附属医院神经外科,[2]医学院人体解剖学教研室,[3]医学院电镜室,南通 226001)

提 要:目的 探讨不同温度生理盐水对大鼠脊髓组织形态及氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)表达的影响。**方法** SD大鼠96只,分成对照组、37 ℃组、20 ℃组、4 ℃组,每组24只。以T_9为中心,打开椎管和硬脊膜。对照组不作生理盐水冲洗,其他3组分别用37、20、4 ℃的生理盐水缓慢冲洗。1 h后关闭椎管,各组术后24 h取材,称干湿质量,进行HE染色、电镜检查和β-NADPH组化染色,每组8只大鼠。**结果** 脊髓含水量:对照组为(66.53±0.61)%,37 ℃组为(66.75±1.00)%改变,20 ℃组为(70.55±0.77)%,4 ℃组为(71.92±2.50)%;对照组和37 ℃组含水量低于20 ℃组和4 ℃组。形态学改变:对照组和37 ℃组无明显改变。20 ℃组、4 ℃组:光镜下主要表现为脱髓鞘和神经元肿胀,部分尼氏体消失。电镜下表现为髓鞘部分崩解,线粒体肿胀,嵴部分消失。表达NOS阳性神经元数量:对照组为(18.75±2.12)个,37 ℃组为(18.63±1.41)个,20 ℃组为(14.75±1.67)个,4 ℃组为(8.13±1.25)个;对照组与37 ℃组NOS阳性神经元数量高于20 ℃组和4 ℃组。**结论** 20 ℃以下温度的生理盐水冲洗对脊髓组织有损害,脑和脊髓手术中应选择37 ℃的生理盐水冲洗。

关键词: 生理盐水;温度;脊髓损伤;一氧化氮合酶
中图法分类号: R322.81;R329.24;R363.123 **文献标识码:** A

Effect of normal saline of different temperature on morphological changes and NOS expression of spinal cord

GAO Yi-lu[1], LIU Zhi-guo[1], SHEN Jian-hong[1], LU Guang-ming[2], ZHANG Tian-yi[3] ([1]Department of Neurosurgery, The Affiliated Hospital, [2]Department of Anatomy, [3]Department of Electron Microscope, Nantong University, Nantong 226001, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of normal saline (NS) of different temperature on morphological changes and nitric oxide synthase (NOS) expression of spinal cord. **Methods** The spinal canal of 96 SD adult rats was opened at T_9. which of 24 rats was flushed with 37 ℃ NS, 24 with 20 ℃ NS, 24 with 4 ℃ NS respectively, and which of 24 rats in control group received no flushing. The spinal canal was closed one hour later, and the spinal cord was taken out 24 hours later. Then the water content in spinal cord was determined by dry-wet method. The morphological changes of spinal cord were observed under light microscope and the electronic microscope. The amount of NOS-positive neuron was measured by β-NADPH histochemical methods. **Results** The water content in spinal cord was (66.53±0.61)% in control group, (66.75±1.00)% in 37 ℃ group, (70.55±0.77)% in 20 ℃ group, (71.92±2.50)% in 4 ℃ group. The spinal cord of control group and 37 ℃ group contained less water than that of 20 ℃ group and 4 ℃ group. There were no obvious morphological changes in the control group and 37 ℃ group. In 20 ℃ and 4 ℃ groups, the demyelination of axon, swelling of cell body and the disappearance of tigroid body were observed under light microscope, the partial disaggregation of medullary sheath, swelling of mitochondria and disappearance of mitochondria crista could be observed under electron microscope. The amount of NOS-positive neuron in spinal cord was (18.75±2.12), (18.63±1.41), (14.75±1.67), (8.13±1.25) in control, 37 ℃, 20 ℃ and 4 ℃ groups, respectively. The control group and 37 ℃ group showed more NOS-positive neuron than those of 20 ℃ group and 4 ℃ group. **Conclusion** NS below 20 ℃ can injury spinal cord. It is suitable to choose 37 ℃ NS to flush brain and spinal card during operation.

Key words: normal saline; temperature; spinal cord injury; nitric oxide synthase

作者简介:高宜录(1960-),男,江苏省新沂市人,博士,主任医师,副教授,主要从事中枢神经再生和脑肿瘤方面的研究,发表论文16篇。电话:(0513)85052362,E-mail: yilugao@hotmail.com

收稿日期:2007-11-05;修回日期:2007-12-01

低温的脑保护作用已经被动物试验和临床实践所证实[1,2]，在脊髓的低温保护研究中，也有报道显示将脊髓低温预处理可以减少压迫性脊髓损伤[3]。一般认为低温神经保护作用的合适温度在28～35 ℃[4]。在脊髓手术中，生理盐水(normal saline，NS)冲洗是保证术野清洁和脊髓湿润的主要手段。实际临床工作中，很少考虑冲洗时NS温度对脊髓组织有无影响而随意使用室温下的NS。不同温度NS冲洗脊髓组织能够产生什么样的影响、是否造成继发性的损伤，目前尚不清楚。本研究采用不同温度的NS冲洗SD大鼠的脊髓，观察术后大鼠脊髓组织水肿程度、形态学改变和一氧化氮合酶(nitric oxide synthase，NOS)阳性神经元数量的变化，以探讨NS温度对脊髓组织的影响。

1 材料与方法

1.1 动物分组

选择清洁级SD大鼠96只(南通大学实验动物中心提供)，约3月龄，体质量(250±30)g，雌雄不拘。分为4组：对照组(不用NS冲洗)，37 ℃ NS冲洗组(37 ℃组)，20 ℃ NS冲洗组(20 ℃组)，4 ℃ NS冲洗组(4 ℃)。每组24只。

1.2 动物模型制作

术前注射青霉素预防医源性感染。实验房间温度控制在25 ℃左右，相对湿度控制在50%左右。称量后用1%戊巴比妥钠(25 mg/kg)腹腔内麻醉，背部手术野剃毛，并用75%酒精消毒。以T_9棘突为中心取后正中纵切口，长约4 cm，暴露T_8～T_{10}的棘突，咬除T_9棘突及全椎板，剪开硬脊膜、蛛网膜，暴露脊髓，约2 cm长，NS冲入蛛网膜下腔，避免直接冲洗脊髓组织，70～80滴/min。用规定温度的NS冲洗脊髓约1 h后，逐层缝合切口。术中、术后以恒温电毯保持加温(37±0.5)℃，以保持实验大鼠的体温；精心饲养，不限制饮水及进食。

1.3 干湿质量法观察脊髓组织中的含水量

术后24 h，分别在每组中取8只大鼠，动物断头处死后，迅速取冲洗段脊髓，用滤纸吸尽表面血渍后，置于已称量的带盖玻璃称样杯中，用电子分析天平称湿质量后，置于100 ℃恒温干燥箱内烤干24 h至恒量(两次称量差<0.2 mg)，称干质量后用Elliot公式计算各部位含水量百分率：脊髓含水量(%)=(湿质量－干质量)/湿质量×100%。

1.4 光镜、电镜标本采集、切片的制作及观察

术后24 h，每组取8只大鼠，仰卧位固定后，剪开大鼠胸腔，通过左心室插入注射器，右心耳放血。先用NS灌注至无血流出，再用4%的多聚甲醛溶液进行灌注、固定。然后，从大鼠背部原手术切口部位进入，取大鼠脊髓NS冲洗段(长约2 cm)，立即用锐利的薄刀片将其切成1 mm^3大小，放入4 ℃的4%戊二醛溶液中进行固定，并放置在4 ℃冰箱中保存。24 h内送电镜室进一步处理，常规电镜制片，用HITACHI H-500透射电子显微镜观察。其余部分放入4%的多聚甲醛溶液中固定24 h，修剪后，石蜡包埋切片，HE染色，光镜下观察。

1.5 脊髓组织冰冻切片β-NADPH组织化学染色

术后24 h，每组取8只大鼠，取材方法同1.4。常规灌注、固定、浸糖后，在冰冻恒冷切片机中冰冻切片。每只大鼠行脊髓冠状面冰冻切片(片厚20 μm)，隔4片取1片，共取5张切片进行β-NADPH组化染色，显示NOS阳性神经元。方法：①将切片移入0.3% Triton X-100(pH 8.0)预浸60 min。②切片移入孵育液，孵育液为(1% β-NADPH，0.1% NBT，0.3% Triton X-100，pH 8.0)。③37 ℃孵育1 h后PBS终止反应。明胶载片裱片风干，常规脱水、透明、封片。显微镜下观察NOS阳性神经元。在脊髓部位因阳性结果呈双侧对称性分布，故取单侧计数，光镜下对脊髓中央管周围所有NOS神经元计数。

1.6 统计学处理

采用SPSS 13.0统计软件，多组间均数比较用F检验，均数间两两比较用q检验。

2 结果

2.1 脊髓组织中的含水量

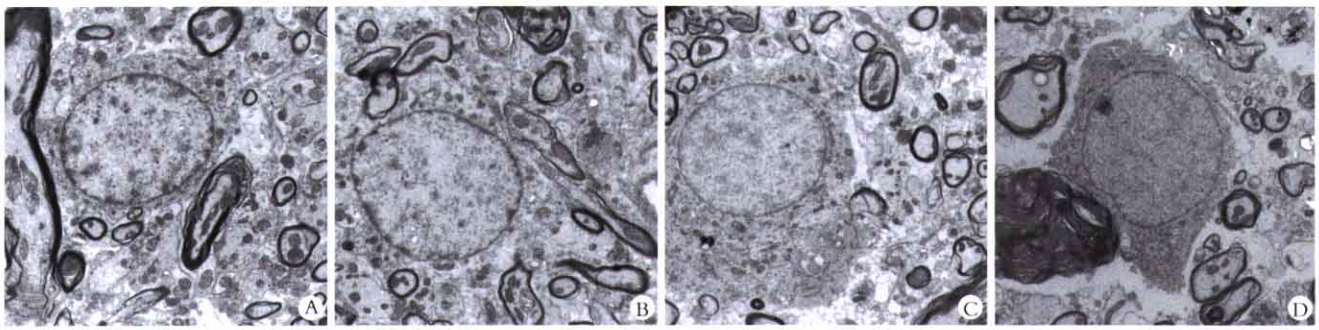
对照组为(66.53±0.61)%，37 ℃组为(66.75±1.00)%，20 ℃组为(70.55±0.77)%，4 ℃组为(71.92±2.50)%；对照组与37 ℃组比较，20 ℃组和4 ℃组比较均无统计学差异($P>0.05$)，而20 ℃组和4 ℃组，对照组和37 ℃组比较差异均有统计学意义($P<0.01$)。

2.2 光镜、电镜观察结果

对照组和37 ℃组无明显形态学变化，20 ℃组、4 ℃组变化较显著。光镜下对照组、37 ℃组神经纤维排列整齐，神经元胞体大，细胞核大而圆，尼氏小体丰富，聚集在核周围。20 ℃组、4 ℃组表现为纤维排列紊乱，海绵样变性和脱髓鞘。灰质中央和前角神经元数量减少，神经元肿胀，可见部分尼氏体溶解(图1)。电镜下对照组、37 ℃组脊髓的神经元胞体大，核内染色质均匀，核膜境界清晰，细胞质内尼氏体的粗面内质网内核糖体排列规则。正常髓鞘围绕轴索呈同心圆排列，板层结构清晰，层间结合紧密。轴索内有微丝和微管，排列规则，其间有少量散在的线粒体。20 ℃组、4 ℃组表现为线粒体肿胀，嵴部分消失，尼氏体的粗面内质网排列紊乱，表面核糖体脱失，核部分固缩、边聚，核膜变模糊。脊髓白质内轴突脱髓鞘改变与轴索的损害同时存在，轴索肿胀，髓鞘松散，少部分完全崩解。微血管内皮细胞严重肿胀，管壁有裂隙(图1)。

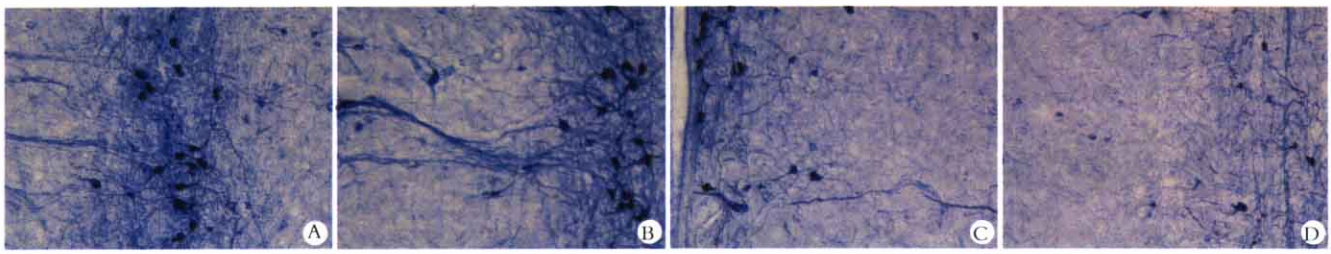
2.3 脊髓β-NADPH组织化学染色结果

NOS阳性神经元呈蓝色，细胞体、树突和轴突均着色，细胞核清亮，不着色。对照组及37 ℃组：脊髓内含大量散在的β-NADPH强阳性神经元，主要分布在中央管的周围，中等大小，卵圆形或三角形，带有2～3个长的突起；NOS阳性细胞数分别为(18.75±2.12)个和(18.63±1.41)个，两组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。20 ℃组及4 ℃组：NOS阳性神经元染色中等，细胞体较大。4 ℃组：阳性细胞染色浅淡，突起变短；NOS阳性细胞数分别为(14.75±1.67)个和(8.13±1.25)个，两组间比较有显著差异($P<0.01$)。20 ℃组和4 ℃组与对照组及37 ℃组比较显著减少，有显著差异($P<0.01$)。见图2。



A：对照组，B：37 ℃组；C：20 ℃组；D：20 ℃组

图 1　不同温度 NS 冲洗大鼠脊髓组织电镜下的形态学变化　（TEM ×8 000）



A：对照组，B：37 ℃组；C：20 ℃组；D：4 ℃组

图 2　不同温度 NS 冲洗大鼠脊髓组织 NOS 阳性神经元的变化　（β-NADPH ×400）

3　讨论

在脑和脊髓的手术中，我们需要长时间、大量的使用 NS 冲洗，以保证术野清洁和所暴露神经组织的湿润。工作中很少考虑到冲洗的 NS 温度对脑和脊髓组织有无影响。多数医师比较随意地使用室温下的 NS 冲洗术中暴露的脑和脊髓，这样是否会造成神经组织的损害，目前尚缺乏实验依据。本研究表明，低于 20 ℃ 的 NS 冲洗脊髓组织，不仅可造成脊髓组织的水肿，还可造成形态学改变。干湿质量法是测量组织水肿程度有效的传统方法，本实验结果表明，使用 20 ℃ 以下的 NS 冲洗脊髓，引起了神经组织含水量增加，亦即导致了神经组织的水肿，而水肿又是引起神经继发损害的原因之一[5]。在20 ℃ 组及 4 ℃组中，光镜下已出现神经纤维排列紊乱，海绵样变性和脱髓鞘，灰质中央和前角神经元数量减少，神经元肿胀，可见部分尼氏体溶解。电镜结果则更进一步显示了其超微结构变化：线粒体肿胀，嵴部分消失，尼氏体的粗面内质网排列紊乱，表面核糖体脱失，核部分固缩、边聚，核膜变模糊，脊髓白质内轴突脱髓鞘改变，轴索肿胀，髓鞘松散，少部分完全崩解，甚至微血管内皮细胞严重肿胀，管壁出现裂隙。邹小明等[6]在研究不同脑灌注方法对深低温停循环脑组织温度、温差的影响实验中也发现在鼻咽温度降至 18 ℃时，60 min 后脑组织出现线粒体数量减少，肿胀变性，线粒体嵴消失，90 min 后更为明显：这些形态学改变至少提示术中使用 20 ℃ 以下的 NS 冲洗脊髓可以导致神经组织形态学上的损害。

NOS 可分为 nNOS、eNOS 和 iNOS 3 种（eNOS 和 iNOS 合称为 cNOS）。nNOS 主要在神经元细胞中表达[7]。在多种组织中 NADPH-d 被认为是 nNOS[8]。β-NADPH 组织化学染色可以显示哺乳类动物中枢神经系统内含 nNOS 的神经元[9]。NOS 是体内催化 L-Arg 合成 NO 的关键酶，产生的 NO 以细胞间信息传递为主，起维持正常生理功能的作用[10]。戴维国等[11]认为在正常大鼠纹状体内 NOS 阳性神经元的生长发育与大鼠运动机能及调控等有重要关系，而在脊髓组织中 NOS 阳性神经元对维持正常的生理功能同样起着重要的作用。本实验结果显示，20 ℃以下的 NS 冲洗的脊髓组织内 NOS 阳性细胞数比对照组及 37 ℃组显著减少，且 NOS 阳性细胞染色浅淡，突起变短，这表明使用低于 20 ℃NS 冲洗脊髓组织至少可以引起神经组织轻度功能损害。

总之，本实验结果显示，低于 20 ℃ 的 NS 冲洗脊髓不仅可以导致神经组织的形态损害，也可引起 NOS 的表达变化，因此我们建议在进行脑和脊髓手术时使用 37 ℃NS 冲洗，以避免造成或加重神经组织的损伤。

参考文献：

[1] 秦华平，梅广海，魏　亮，等. 深低温对全脑缺血大鼠海马即早基因组表达的影响[J]. 中华神经外科杂志，2006，22(11)：655－658.

[2] 江基尧，徐　蔚，杨朋范. 选择性脑超深低温技术对猴颈动脉血

流阻断时限的研究[J]. 中华神经外科杂志, 2003, 19(4): 304-306.

[3] Jou I M. Effects of core body temperature on changes in spinal somatosensory-evoked potential in acute spinal cord compression injury: an experimental study in the rat[J]. Spine, 2000, 25(15): 1878-1885.

[4] 包正夫, 徐 蔚. 低温脑保护技术的现状与进展[J]. 昆明医学院学报, 2007, 28(1): 107-109,112.

[5] Gong Y, Hua Y, Keep R F, *et al*. Intracerebral hemorrhage: effects of aging on brain edema and neurological deficits[J]. Stroke, 2004, 35(11): 2571-2575.

[6] 邹小明, 高 勇, 王武军, 等. 不同脑灌注方法对深低温停循环脑组织温度、温差的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2007, 24(3): 271-273.

[7] 向 强, 文 亮, 高强国, 等. 内毒素预处理对大鼠全脑缺血再灌注脑区一氧化氮合酶的影响研究[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(13): 1404-1406.

[8] Ramanathan S, Combes D, Molinari M, *et al*. Developmental and regional expression of NADPH-diaphorase/nitric oxide synthase in spinal cord neurons correlates with the emergence of limb motor networks in metamorphosing Xenopus laevis[J]. Eur J Neurosci, 2006, 24(7): 1907-1922.

[9] 雷德亮, 罗学港, Mouton P R, 等. 神经元性一氧化氮合酶活性在app/ps1双转基因AD模型小鼠皮质和海马的分布[J]. 神经解剖学杂志, 2004, 20(4): 377-382.

[10] Pharmacology of nitric oxide: molecular mechanisms and therapeutic strategies[J]. Curr Pharm Des, 2004, 10(14): 1667-1676.

[11] 戴维国,朱望东,马常升, 等.大鼠纹状体一氧化氮合酶阳性神经元的生后分布及发育[J]. 解剖学杂志, 2003, 26 (6): 572-575.

(编辑 王小寒)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2007)24-2360-01

50例危重新生儿T细胞亚群及免疫抗体的检测

王成秀[1],符 州[2],谢 琴[2],王莉佳[2] ([1]重庆市涪陵中心医院儿科,重庆 408000;[2]重庆医科大学附属儿童医院呼吸内科,重庆 400014)

为了解危重新生儿免疫功能的改变,我们选取50例危重新生儿做了T细胞亚群、免疫抗体的检测,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

淋巴细胞分离液(天津灏洋生物有限公司),小牛血清(中国医学科学院生物工程研究所),免疫球蛋白检测试剂盒(深圳市国赛生物技术有限公司),Nephstar特定蛋白分析仪,流式细胞仪为BD FAcsCalibur。

1.2 对象

选取危重新生儿50例,均符合新生儿危重病历评分法[1],男性30例,女性20例,体胎龄35周,平均体质量(2 226.27±790.32)g,早产儿28例,足月儿22例。其中极危重患儿(即评分在72分以下的)共6例。正常健康新生儿25例作为对照,满足生后Apgar评分均为10分,一般情况好,男性13例,女性12例,平均胎龄37周,体质量(2 580.61±685.32)g。无菌操作采集危重新生儿及正常新生儿外周静脉血3 ml(肝素抗凝)备用。

1.3 方法

取全血70 μl检测T细胞亚群$CD4^+$、$CD8^+$。用流式细胞检测法,按说明书操作。待凝血后取血清200 μl于EP管,-20 ℃保存检测免疫球蛋白IgG、IgA、IgM。用散射比浊法,按说明书操作。

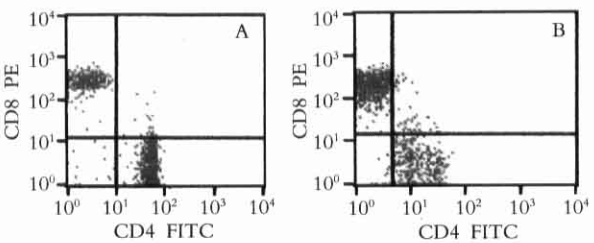
1.4 统计学分析

数据均以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 13.0统计软件进行t检验。

2 结果

2.1 T细胞亚群检测结果

图1显示危重新生儿的$CD4^+$及$CD4^+/CD8^+$均降低。



A: 对照组; B: 危重组

图1 两组T细胞亚群流式细胞仪检测结果

2.2 血清免疫球蛋白检测结果

表1显示危重新生儿组IgG、IgA、IgM、CD4(%)均数正常对照组显著降低($P<0.01$);CD8(%)较正常对照组显著升高($P<0.01$)。

表1 危重组及健康对照组血清免疫球蛋白水平(g/L, $\bar{x}\pm s$)

组别	例数	IgG	IgA	IgM	CD4(%)	CD8(%)
对照组	25	9.41±1.19	0.65±0.18	0.70±0.14	74.71±8.58	21.16±8.12
危重组	50	7.24±2.56	0.40±0.18	0.48±0.26	35.25±8.34	63.89±10.50
P		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

作者简介:王成秀(1971-),女,重庆市涪陵区人,硕士,副主任医师,主要从事小儿变态反应性疾病方面的研究。电话:(023)72237126

收稿日期:2007-01-15;修回日期:2007-05-08

(下转2366页)